

# Crecimiento de las células de *Nicotiana tabacum* NT-1 en suspensión activado por insulina

Grisel Fierros Romero, Rocio Peña Correa, María Elena Mellado Rojas y Elda María Beltrán Peña

Laboratorio de Transducción de Señales. Edificio B3. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich. Ciudad Universitaria, C. P. 58030

## Resumen

La insulina es una hormona que en mamíferos desempeña diversas funciones metabólicas, además de estimular el crecimiento de las células y su diferenciación. En diferentes ensayos con plantas se ha reportado que la insulina incrementa el crecimiento a través de la ruta de señalización PI3K, al igual que en mamíferos. A diferencia de los animales, los vegetales han adaptado su morfogénesis y desarrollo en respuesta a señales ambientales. Los cultivos de células de tabaco NT-1 en suspensión son un modelo de investigación usado ampliamente en estudios de biología celular y molecular de plantas. En este trabajo encontramos que la adición de 1.23 nM y 12.3 nM de insulina a los cultivos NT-1 durante la fase estacionaria incrementó la masa y volumen celular a través de la activación de la ruta de señalización PI3K.

**Palabras clave:** *insulina, cultivos en suspensión NT-1, PI3K*

## Abstract

Insulin is an hormone that in mammals plays several metabolic functions in addition to stimulate cell growth and differentiation. In different trials in plants, it has been reported that insulin increases growth through PI3K signaling pathway, like that found in mammals. Unlike animals, plants have adapted their morphogenesis and development in response to environmental signals. NT-1 suspension cell cultures are a research model widely used in studies of cellular and molecular biology of plants. In this work we found that addition of 1.23 nM and 12.3 nM of insulin during the stationary phase of NT-1 suspension cell cultures, increased mass and cell volume through of PI3K signaling pathway activation.

**Key words:** *Insulin, NT-1 suspension cell culture, PI3K*

## Introducción

Los cultivos de células vegetales en suspensión consisten de células aisladas y dispuestas en racimos que proceden de un fragmento de la planta (explante) crecido *in vitro* en medio nutritivo suplementado con fitoreguladores (principalmente auxinas y citocininas). Dicho explante en tales condiciones, crece como una masa de células indiferenciadas conocida como callo. Cuando el tejido calloso es transferido a medio líquido se obtienen cultivos celulares en suspensión (Franklin y Dixon, 1994; Loyola-Vargas y Vázquez-Flota, 2006). Estos cultivos presentan ventajas únicas como homogeneidad, el control de parámetros extracelulares y la continua disponibilidad de biomasa. Los cultivos en suspensión del género *Nicotiana* como modelo de investigación se han usado ampliamente en estudios de biología celular y molecular de plantas. El crecimiento de las células vegetales en suspensión presenta una cinética que comprende tres fases: i) Lag o de adaptación al medio, (ii) Log o de crecimiento exponencial y (iii) estacionaria. En cada una de las fases antes mencionadas se presentan varios tamaños celulares, además de una gran diversidad en la expresión genética (Nagata *et al.*, 2004). Durante la fase estacionaria los cultivos muestran una alta expresión de genes que codifican para proteínas cinasas transmembranales, canales iónicos y factores de transcripción, lo que sugiere que durante esta etapa se lleva a cabo la captación

de señales extracelulares (Matsuoka *et al.*, 2004). En mamíferos, se ha reportado que la insulina es una hormona que desempeña un papel central en metabolismo de carbohidratos y otras biomoléculas, además de estimular el crecimiento de las células y su diferenciación. Después del descubrimiento de la insulina, Collip en 1923 reportó la presencia en plantas de sustancias parecidas a la insulina a las cuales denominó “glucocininas”. En 1999 Sánchez de Jiménez *et al.*, mostraron que la adición de 1.23 nM (200 mU/ml) de insulina bovina a semillas de maíz aceleraba la germinación y el crecimiento de plántulas. Posteriormente, este mismo grupo de investigación purificó a partir de ejes embrionarios de maíz una proteína de 20 kDa (Beltrán-Peña, 1997) con actividad similar a la insulina bovina (García-Flores *et al.*, 2001).

La activación de la cascada de señalización por insulina o factores de crecimiento parecidos a la insulina en mamíferos, inicia cuando ésta se une a su receptor, el cual se autofosforila, y cataliza la fosforilación de proteínas celulares activando diversas rutas de señalización; entre ellas, la cascada de la fosfatidil inositol-3-cinasa (PI3K) y la ruta de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Saltiel y Kahn, 2001). La cinasa PI3K cataliza la fosforilación del lípido de membrana, el fosfatidil inositol 4,5 difosfato (PIP2) a fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3). El PIP3 permite entonces, el reclutamiento en

✉ **Autor de correspondencia:** D.C. Elda María Beltrán Peña. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Edificio B3, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Ciudad Universitaria. Francisco J. Múgica s/n. Morelia, Mich. C.P. 58030. e-mail: eldabelt@umich.mx.

la membrana plasmática de proteínas como las cinasas PDK1 y PKB/Akt. PDK1 fosforila y activa a PKB/Akt que a su vez activa a la cinasa mTOR, la cual fosforila a la proteína de enlace al factor de inicio de la traducción eIF4E (4EBP) y a la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K) (Manning y Cantley, 2003). Para estudiar la cascada de señalización de PI3K ha sido de gran utilidad el uso de inhibidores farmacológicos (Pearson *et al.*, 1995); uno de ellos es el LY294002 que actúa *in vivo* como un inhibidor altamente selectivo de la PI3K en mamíferos (Vlahos, 1994). Otro es la rapamicina, ésta se une a la inmunofilina FKBP12, para formar un complejo que se enlaza a mTOR, bloqueando así la fosforilación de S6K y 4EBP (Brunn *et al.*, 1996). Con base a los antecedentes citados, en el presente estudio se analizaron los cambios que induce la insulina sobre el crecimiento de los cultivos celulares NT-1 y se determinó si dichas alteraciones involucran a la cascada de señalización PI3K.

## Materiales y métodos

### Cultivos celulares NT-1

Los cultivos de células de *Nicotiana tabacum* NT-1 en suspensión se crecieron y mantuvieron en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con sacarosa al 3%, 0.2 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 mg/l de 2,4-D y una mezcla de vitaminas (tiamina/mioinositol, 1.0/100 mg/l) (Nagata *et al.*, 1992). Las células se subcultivaron cada siete días inoculando 3.5 ml de un cultivo NT-1 en fase estacionaria a 50 ml de medio fresco e incubando los cultivos a 25 °C en oscuridad con agitación constante a 120 rpm (Franklin y Dixon, 1994).

### Ensayos con insulina e inhibidores

100 ml de un cultivo celular NT-1 de siete días de edad, se filtró y lavó con un litro de medio MS (sin vitaminas ni auxinas) y agitación suave con una espátula. Las células lavadas se resuspendieron en 100 ml de medio MS, se tomaron alícuotas de 7 ml de dicho cultivo para inocular tres matraces con 100 ml de medio suplementado con 0, 1.23 nM y 12.3 nM de insulina. La solución stock de insulina (1405  $\mu\text{U}/\mu\text{l}$ ) se preparó disolviendo 1.0 mg de insulina (equivalente a 28.1 U) en 20 ml de agua tridestilada y se esterilizó por filtración. En otros experimentos, además de la adición de insulina a diferentes concentraciones, los cultivos fueron suplementados con 30  $\mu\text{M}$  de LY294002 y 20 nM de rapamicina. Las soluciones stock de los inhibidores se prepararon disolviendo ambos compuestos en etanol puro. La insulina y los inhibidores se adicionaron al mismo tiempo en la fase estacionaria, es decir, cuando se inocularon los diferentes medios con las células lavadas y resuspendidas en medio fresco.

### Determinación de los parámetros de las cinéticas de crecimiento (VPC, PF, PS), proteínas totales, índice mitótico y tamaño celular

Las cinéticas de crecimiento se determinaron tomando alícuotas diarias de 3 ml de los cultivos de 100 ml donde se evaluaron los siguientes parámetros: Volumen de Paquete Celular (VPC); 3 ml del cultivo se centrifugaron a 2000 rpm /5 min en tubos Falcon de 15 ml, el VPC se determinó de acuerdo a la graduación del

tubo. Peso Fresco: Las muestras se filtraron sobre papel Whatman No. 1 (puesto previamente a peso constante a 80 °C), se pesaron y la diferencia de peso fue registrada. Peso Seco: Las muestras filtradas sobre un papel Whatman No. 1 (a peso constante) se secaron toda la noche en una estufa a 80 °C. El peso seco se determinó por diferencia de peso.

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford: Se extrajeron las proteínas totales moliendo las muestras con nitrógeno líquido, al polvo obtenido se adicionó una mezcla de amortiguadores de extracción de proteínas (Q y G7) en relación 1:1. Buffer Q: Tris-HCl 0.2 M, KCl 0.2 M,  $\text{MgCl}_2$  35 mM, EGTA 25 mM, sacarosa 0.2 M, Polietilen-10-tridecileter 2%, Heparina 0.5 mg/ml y 2-mercaptoetanol 100 mM. Buffer G7: KCl 100 mM, Hepes 20 mM, EDTA 0.2 mM, Glicerol 10%, Tritón X-100 0.1%, Benzamidina 10 mM y el inhibidor de proteasas fenilmetansulfonilfluoruro (PMSF) 2 mM. Los extractos celulares fueron centrifugados 10 min a 8000 rpm, el sobrenadante de cada una de las muestras se separó y se congeló a -20 °C. La cuantificación de las proteínas se realizó interpolando los valores de absorbencia (Abs) de las muestras problema en una curva estándar de albúmina sérica de bovino (BSA). Esta última se obtuvo con diferentes alícuotas de una solución de BSA llevadas a un volumen de 800  $\mu\text{l}$  con agua tridestilada, donde se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de reactivo Bradford a cada una de las muestras. La Abs fue leída a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman 650.

Índice mitótico. Las células se colectaron con puntas de 1ml -recortadas de la punta- e incubaron en hielo durante 15-20 min; una vez retirado el sobrenadante, las células sedimentadas se resuspendieron en un volumen -igual al colectado- de solución fijadora de paraformaldehído-glutaraldehído y se incubaron por lo menos 12 horas a 4 °C. La solución fijadora fue retirada y se añadieron 0.5 ml de PBS 1X y 1  $\mu\text{l}$  de solución stock de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), posteriormente se incubaron por un mínimo de 6 h a 4 °C. El índice mitótico se determinó por microscopía de epifluorescencia contando el número de células en mitosis dividido por el número total de células contadas (400 células) y multiplicado por 100 (Singh, 2002). Se tomaron fotografías de las células NT-1 teñidas con DAPI en un microscopio NIKON de epifluorescencia con cámara COOLPIX10 VR de 6.0 megapíxeles 10X zoom. Con ayuda del analizador gráfico ImageJ 1.43u, se midieron la longitud y el ancho de 40 células por tratamiento (Mravec *et al.*, 2008).

La solución fijadora de paraformaldehído-glutaraldehído fue preparada en la siguiente forma: se calentaron 25 ml de buffer de fosfatos salinos 1X (PBS) pH 7.4 a 60-70 °C, adición lenta de 2g de paraformaldehído (4% w/v) con agitación constante hasta su disolución. Se dejó enfriar para añadir 3 ml de glutaraldehído acuoso al 50%. La solución se aforó a 50 ml con PBS 1X pH 7.4 y fue almacenada a 4 °C.

## Resultados

### Efecto de la insulina sobre el crecimiento de las células de *N. tabacum* (NT-1) en suspensión

Las cinéticas de crecimiento obtenidas mostraron las fases de crecimiento características de los cultivos celulares en suspensión:

Lag en los primeros días del cultivo, Log del tercero al sexto día, a partir del cual los cultivos entraron en fase estacionaria. El aumento en peso fresco en los cultivos NT-1 se observó marcadamente en los últimos días de la cinética en ambos tratamientos con insulina (Fig. 1A). Mientras que el control mostró un decremento en

el crecimiento durante la fase estacionaria. Por otra parte, el incremento de peso seco se representa en la Fig. 1B, donde se observó que ambos tratamientos con insulina indujeron un aumento en el crecimiento desde el segundo día de la cinética, siendo la concentración de 1.23 nM la más significativa. En la Fig. 1C donde se muestra el crecimiento evaluado por VPC, parámetro que refleja el tamaño celular, podemos observar que el cultivo suplementado con 1.23 nM de insulina presentó un mayor volumen celular respecto al de 12.3 nM. Sin embargo, ambos tratamientos fueron superiores al control a partir de segundo día de la cinética, coincidiendo así con el comportamiento de las cinéticas evaluadas por peso seco (Fig. 1B)

Respecto a la síntesis de proteínas evaluada durante las cinéticas de los cultivos celulares, observamos un incremento en el crecimiento desde la fase Log en ambos cultivos suplementados con insulina (Fig. 2). Como podemos ver en esta última figura todas las curvas de crecimiento presentan una caída abrupta después de la fase estacionaria, debido probablemente a una disminución en la síntesis de proteínas y/o degradación de las mismas.

**Efecto de los inhibidores LY294002 y rapamicina sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 suplementados con insulina**

Después de determinar que la insulina incrementaba el crecimiento de las células NT-1 en suspensión, tratamos de dilucidar si tal efecto se debía al encendido de la ruta de señalización PI3K, para lo cual se adicionó a los cultivos rapamicina como inhibidor de mTOR (Vézina et al., 1975) y LY294002 inhibidor de la PI3K en mamíferos (Vlahos, 1994). Los inhibidores antes mencionados se han utilizado en varios sistemas vegetales: en ejes embrionarios de maíz la rapamicina se ensayó a una concentración de 100 nM (Sánchez de Jiménez et al., 1999), mientras que en cultivos en suspensión de *Arabidopsis* los inhibidores se probaron a concentraciones de 20 nM de rapamicina y 50 µM de LY294002 (Turck et al., 2004). Debido a

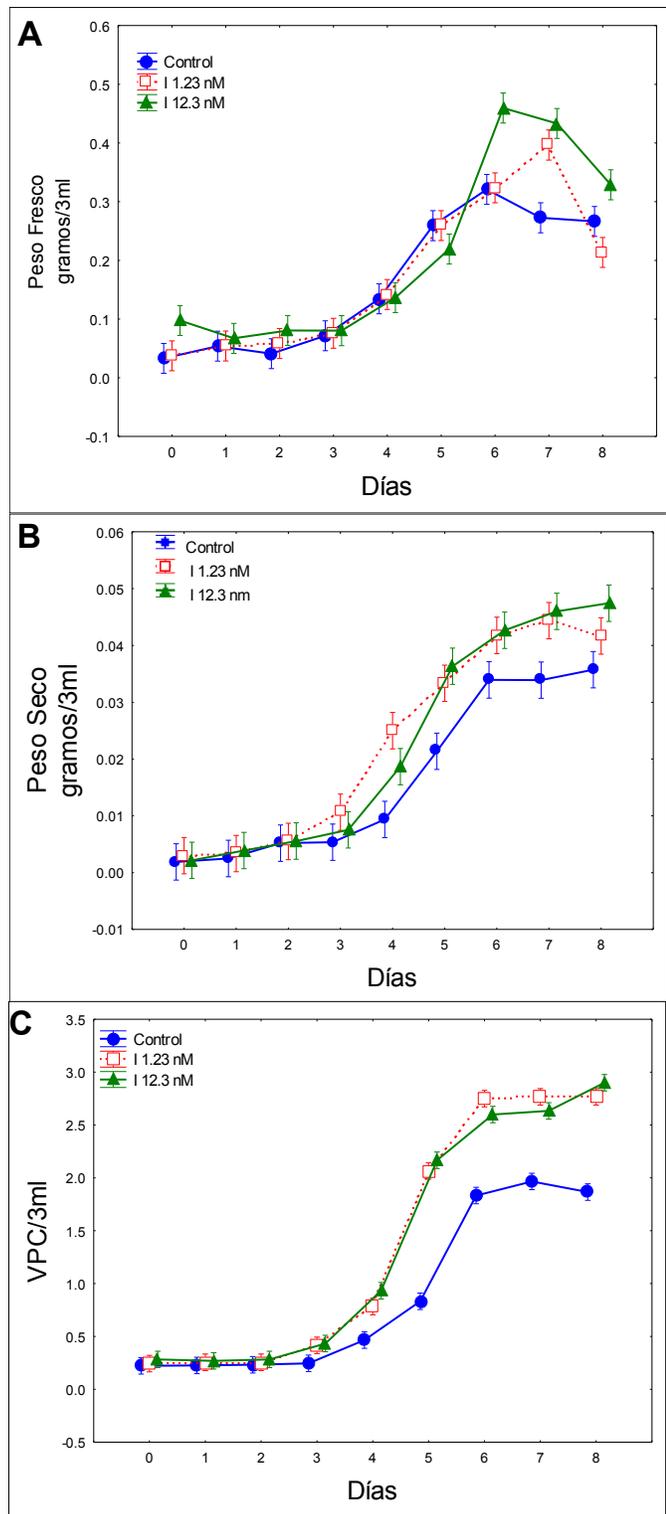


Figura 1. Crecimiento de los cultivos celulares de *N. tabacum -1* en suspensión inducido por insulina. (A) Peso fresco. (B) Peso seco. (C) Volumen de paquete celular de alícuotas de 3ml. Cultivos con diferentes tratamientos de insulina: Control, 1.23 nM y 12.3 nM. ANOVA. P=0.05; n=3. STATISTICA ver. 8.0

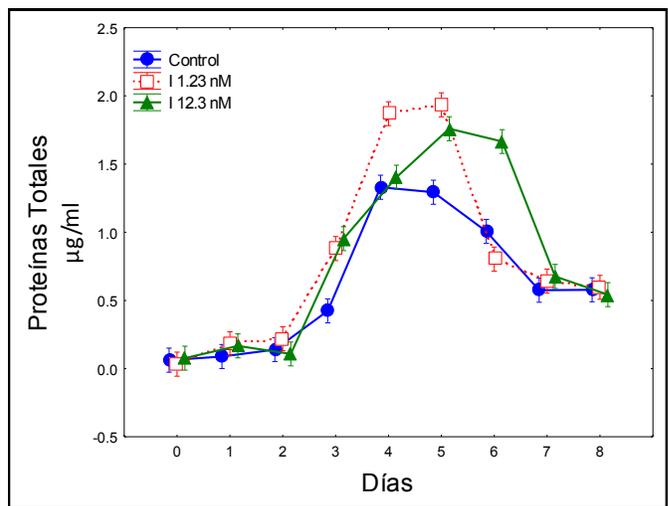


Figura 2. Cinéticas de crecimiento de los cultivos celulares de *N. tabacum -1* evaluadas por proteínas totales. Cuantificación de proteínas de los cultivos de tabaco en suspensión, suplementados con insulina. ANOVA P=0.05; n=3. STATISTICA ver. 8.0

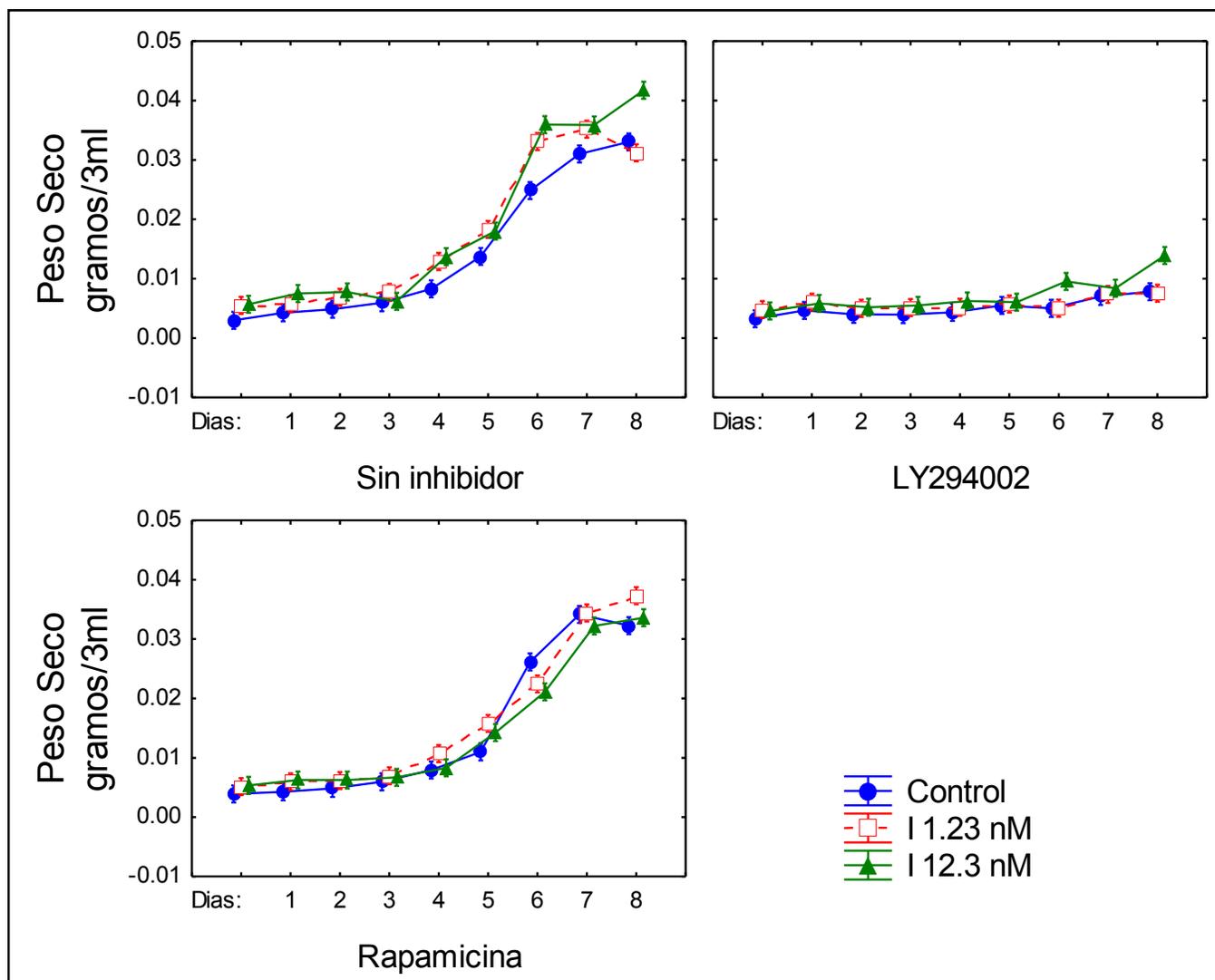


Figura 3. Cinéticas de crecimiento de los cultivos de *N. tabacum -1* suplementados con insulina e inhibidores LY294002 y rapamicina, determinadas por peso seco. Cultivos ensayados en medios suplementados con 1.23 nM y 12.3 nM de insulina más 20 nM de rapamicina y 30  $\mu$ M de LY294002 con sus respectivos controles. ANOVA n=2. STATISTICA ver. 8.0

que el sistema que utilizamos en el presente estudio es un cultivo de células en suspensión, decidimos ensayar 20 nM de rapamicina y 30  $\mu$ M de LY294002. Como podemos observar en las figuras 3 y 4, donde se muestran las evaluaciones de las cinéticas de crecimiento de los cultivos de células NT-1 en suspensión por peso seco y VPC respectivamente; 20 nM de rapamicina ocasionó una disminución del crecimiento estimulado por 1.23 nM y 12.3 nM de insulina, comportándose de manera similar al control. Es decir, que en presencia de rapamicina el efecto estimulador de la insulina sobre el crecimiento celular, fue nulificado. Por otra parte, en los cultivos donde se agregó 30  $\mu$ M de LY294002 el crecimiento fue abatido en todos los cultivos, lo que indicó que dicha concentración resultó tóxica para las células.

**Índice mitótico y tamaño celular de los cultivos NT-1 en suspensión con insulina y rapamicina**

Las células cuando crecen necesitan sintetizar proteínas para aumentar de tamaño y así poder dividirse (Morgan, 2007). La división celular puede cuantificarse midiendo el porcentaje de

índice mitótico (IM), el cual indica la cantidad de células en división. Los porcentajes encontrados en este estudio fueron en condiciones control: 1% en la fase Lag, 15% en la Log y 2.5% en la fase estacionaria, notándose un incremento de dicho parámetro en los cultivos suplementados con insulina a 1.23 nM donde el índice mitótico en la fase Lag fue de 1.3%, Log 20% y estacionaria 7.5%. Mientras que con 12.3 nM correspondió a 1.2% en la fase Lag, en la fase Log 19% y en la fase estacionaria de 4.0% (Fig. 5). Podemos observar en la Fig. 5 que los cultivos a los que se adicionó rapamicina al medio de cultivo, mantuvieron un índice mitótico menor a los tratamientos con insulina y similares al control.

En lo que concierne al tamaño celular, encontramos que las células de los cultivos con insulina a las dos concentraciones ensayadas, presentaron un tamaño mayor respecto al control en las fases de crecimiento Lag y estacionaria, siendo dicho efecto más marcado en esta última fase. Mientras que los cultivos suplementados con insulina y rapamicina en las dos fases antes mencionadas, mostraron tamaños similares al control (datos no

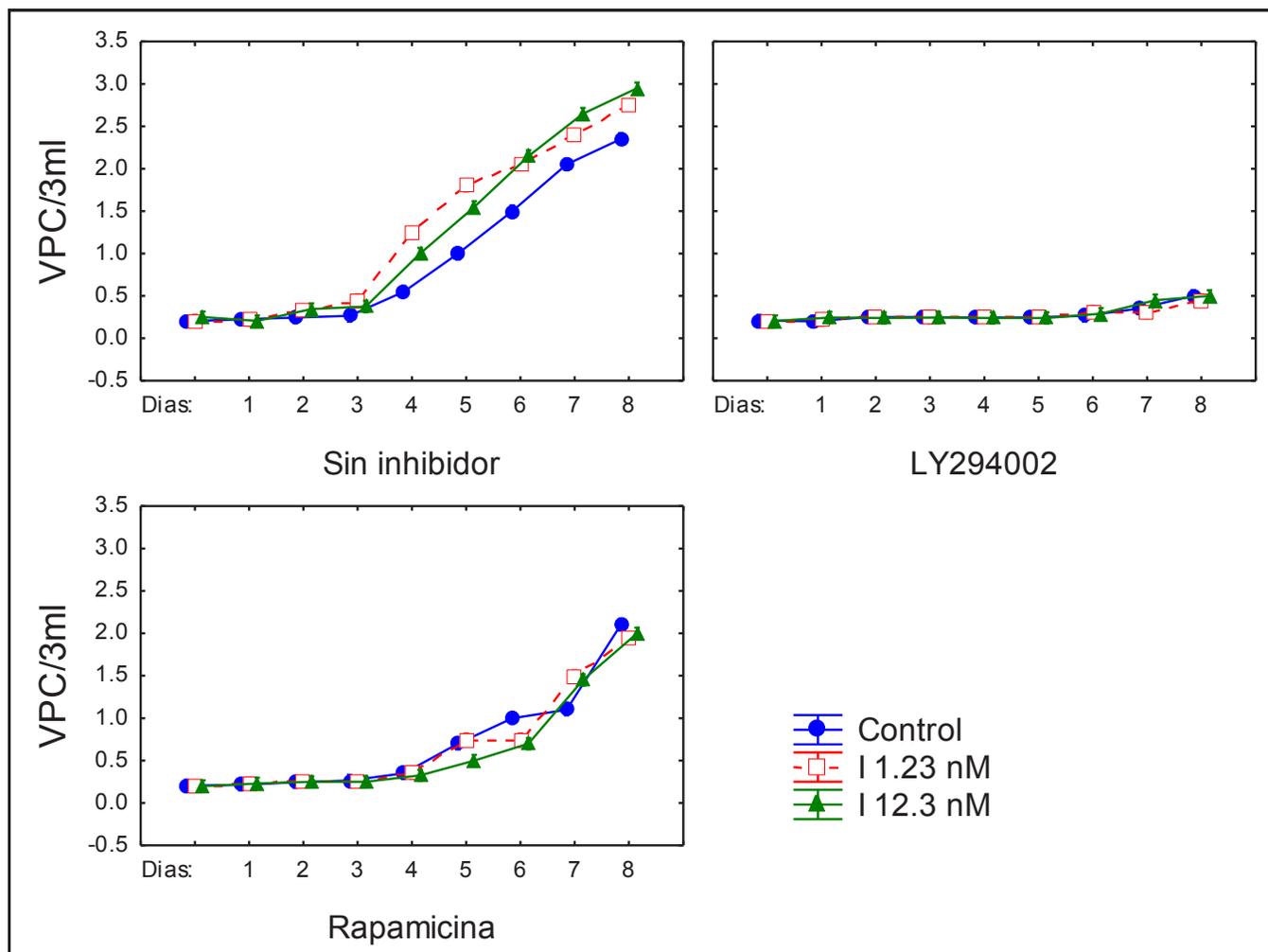


Figura 4. Cinéticas de crecimiento de los cultivos celulares NT-1 suplementados con insulina e inhibidores LY294002 y rapamicina, evaluadas por VPC. Cultivos suplementados con insulina y los inhibidores de la ruta PI3K/TOR. ANOVA n=2. STATISTICA ver: 8.0

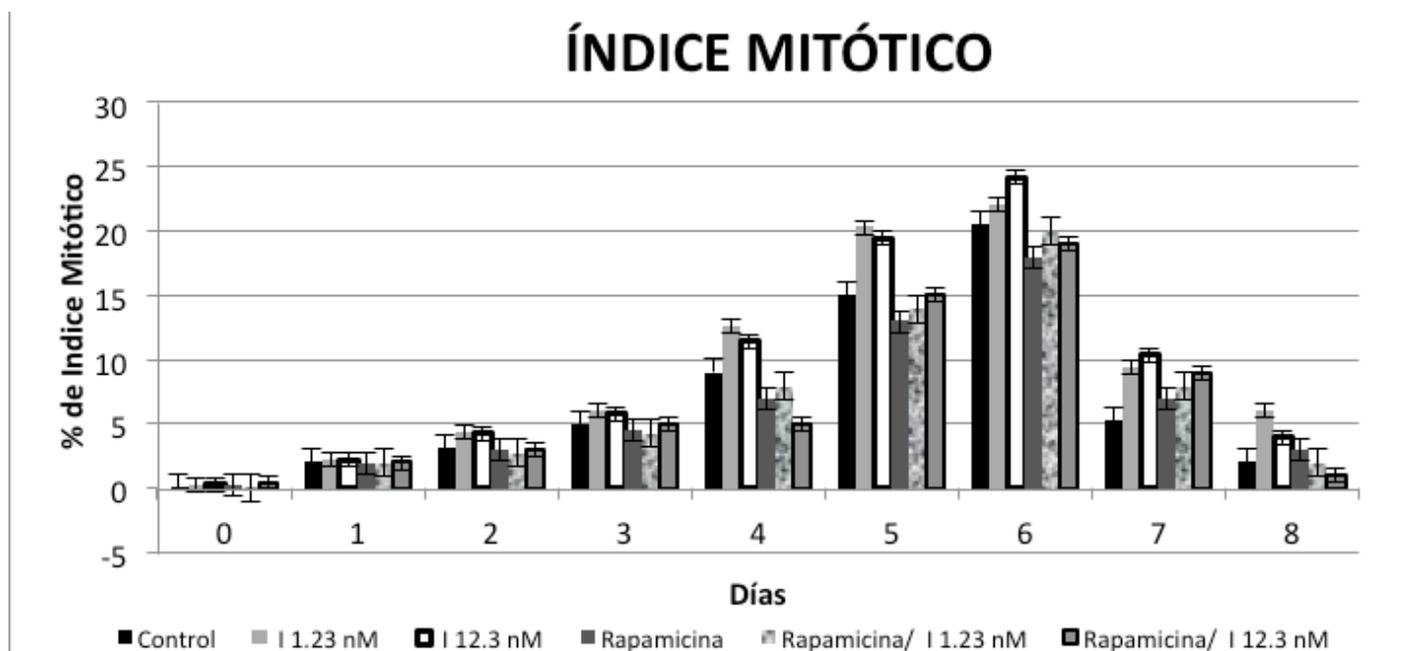


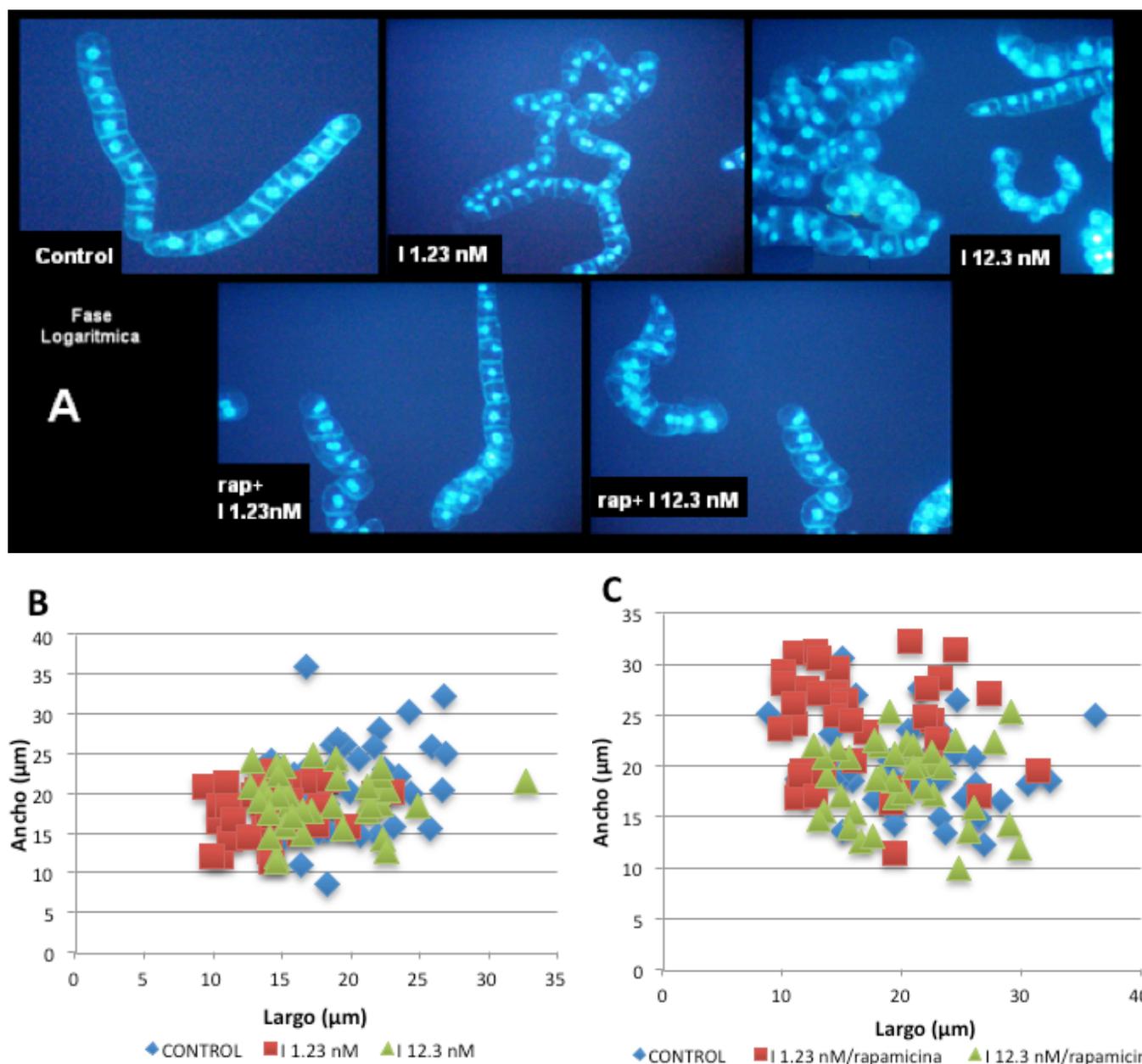
Figura 5. Índice mitótico de los cultivos celulares NT-1 suplementados con insulina y rapamicina. El crecimiento fue determinado durante ocho días en los cultivos con tratamiento de insulina más rapamicina y controles. ANOVA P=0.05; n=2. STATISTICA ver: 8.0

mostrados). En la **Fig. 6** se presentan las imágenes de las células teñidas con DAPI de los tratamientos con insulina y con insulina más rapamicina en fase de crecimiento Log. Podemos observar que las células en ambos tratamientos, 1.23 nM y 12.3 nM de insulina, mostraron un tamaño menor al control. En la misma figura se aprecia como las células de los cultivos suplementados con insulina y rapamicina presentan una morfología semejante al control. Para determinar cuantitativamente si el tamaño celular se modificaba por efecto de la insulina, medimos las células con un analizador de imágenes. En la **Fig. 6B**, podemos observar que la población con células más pequeñas fue la proveniente de los cultivos adicionados con 1.23 nM de insulina. Por otra parte,

el tamaño de las células tratadas con ambas concentraciones de insulina y rapamicina fue similar al control, presentándose incluso células con un tamaño mayor que el control bajo el efecto de 1.23 nM de insulina (**Fig. 6C**).

### Discusión

El crecimiento de las células de *Nicotiana tabacum-1* (NT-1) en suspensión y adicionadas de insulina se monitoreó durante ocho días. Los parámetros de crecimiento determinados fueron: peso fresco, peso seco y volumen de paquete celular. Se obtuvieron las cinéticas de crecimiento (Figuras 1, 2), las cuales fueron similares a las de células de tabaco BY-2 en suspensión descritas por



**Figura 6. Morfología de las células de los cultivos NT-1 suplementados con insulina e insulina más rapamicina.** A) Imágenes representativas de células teñidas con DAPI en fase Log -4 días- en medios de cultivo adicionados con dos concentraciones de insulina e insulina más 20nM de rapamicina. Las células se observaron en un microscopio Nikon de epifluorescencia. B y C) Tamaño de las células de los cultivos NT-1 en fase Log. B) Células provenientes de cultivos suplementados con insulina a dos concentraciones. C) Células de cultivos adicionados con insulina más 20 nM de rapamicina. Las mediciones se hicieron a 40 células de 4 días de crecimiento con ayuda del programa Image J 1.43u.

Matsuoka (2004). Al cuantificar el crecimiento por peso fresco y seco, se obtuvieron curvas diferentes entre estos parámetros (Fig. 1), lo anterior podría deberse a que al medir el peso fresco, las células retienen agua del medio de cultivo, razón por la cual es más confiable cuantificar la masa de las células NT-1 por peso seco. En cuanto al volumen de paquete celular (Fig. 2), el incremento de tamaño se observa marcadamente en los cultivos celulares NT-1 suplementados con insulina (1.23 nM y 12.3 nM). El aumento del crecimiento que encontramos en los cultivos NT-1 por efecto de la insulina, coincide con lo reportado anteriormente por diferentes autores, como en el caso del incremento en la germinación de las semillas en diferentes especies vegetales como espinaca, pepino, sandía, semillas de girasol y de maíz (Collier *et al.*, 1987; Goodman y Davies, 1993; Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999). En lo que concierne a la respuesta de las células NT-1 a la insulina, en el presente estudio observamos un incremento en el crecimiento, al igual de lo reportado por Turck *et al.* (2004) en cultivos de *Arabidopsis* por efecto de auxinas y citocininas. El incremento de proteínas observado durante la fase Log (Fig. 2), podría explicarse por el hecho de que la insulina dispara la cascada de señalización PI3K, induciendo un incremento en la síntesis de proteínas con el consiguiente aumento de masa de las células NT-1, lo que les permite posteriormente dividirse (Fingar y Blenis, 2004). En nuestros cultivos, ambas concentraciones de insulina (1.23 nM y 12.3 nM) indujeron un aumento en el crecimiento, a diferencia de lo reportado en estudios con ejes embrionarios de maíz donde la concentración de 1.23 nM de insulina estimulaba el crecimiento y 12.3 nM lo inhibía (Sánchez de Jiménez *et al.* 1999). En mamíferos la insulina y factores de crecimiento activan la cascada de señalización PI3K (Saltiel y Kahn, 2001), esta ruta también ha sido implicada en plantas en la respuesta a insulina, con el uso de inhibidores de la cascada PI3K como son wortmanina y rapamicina (Sánchez de Jiménez *et al.* 1999). Para comprobar si la ruta PI3K participa en el crecimiento de las células de tabaco NT-1 en suspensión mediado por insulina, en este trabajo, ensayamos los inhibidores LY294002 y rapamicina. La susceptibilidad a rapamicina es ampliamente conocida entre eucariontes. Sin embargo, hay reportes de una resistencia de *Arabidopsis* a la acción de la rapamicina, aunque las algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii* son susceptibles (Crespo *et al.*, 2005). En el presente estudio observamos que la rapamicina (Figs. 3 y 4) inhibió el crecimiento de los cultivos tratados con insulina, al igual que lo reportado para maíz (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999) y a diferencia de los cultivos en suspensión de *Arabidopsis* donde la rapamicina no alteró el crecimiento celular (Turck *et al.*, en 2004). Respecto a los cultivos NT-1 suplementados con insulina y LY294004 (Figs. 3 y 4), la concentración de 30  $\mu$ M de dicho inhibidor fue tóxica a diferencia de lo reportado por Turck *et al.* (2004) donde los cultivos en suspensión de *Arabidopsis* inhibieron su crecimiento en presencia de LY294004 a 50  $\mu$ M, concentración aún más alta que la empleada en el presente estudio.

Se tienen valores de índice mitótico reportados para las células de tabaco TBY-2 en suspensión, en la fase Lag 3.4%, en la Log 10.6% y en la estacionaria de 0% (Matsuoka *et al.*, 2004) que fueron similares a los obtenidos para los cultivos NT-1 (Fig. 5). La disminución de índice mitótico, peso seco y VPC como

consecuencia del uso de rapamicina, comprueba la implicación de la ruta PI3K disparada por insulina. Previamente se habían reportado variaciones en el tamaño celular de los cultivos TBY-2, donde células grandes se presentaban en las fases Lag y estacionaria y pequeñas en la Log (Nagata *et al.*, 1992). En la fase Lag debido a la adaptación al medio y en la estacionaria por el agotamiento de nutrientes, lleva a las células a obtener una masa crítica sin una posterior división celular (Sano *et al.*, 1999). En el presente estudio observamos que las células suplementadas con ambas concentraciones de insulina fueron más grandes durante las fases Lag y estacionaria respecto al control. Mientras que durante la fase Log, las células de cultivos suplementados con ambas concentraciones de insulina presentaron un menor tamaño, lo cual fue más evidente con la concentración de 1.23 nM (Figs. 6B, 6C). Además, los efectos mitogénicos antes señalados fueron revertidos en presencia de rapamicina. Por lo antes mencionado, concluimos que la insulina en concentraciones de 1.23 nM y 12.3 nM promueve el crecimiento de las células de tabaco NT-1 en suspensión a través de la ruta de señalización PI3K, induciendo tanto aumento en tamaño como incremento en proliferación celular.

## Agradecimientos

A la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al COECYT y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT Proyecto 48712) por el apoyo al desarrollo del presente proyecto.

## Referencias

- Beltrán Peña E.** 1997. *Expresión genética de las proteínas ribosomales durante la germinación del maíz*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Brunn GJ, Williams J, Sabers C, Wiederrecht G, Lawrence Jr JC, Abraham RT.** 1996. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J.*, 15: 5256-5267.
- Collier E, Watkinson A, Cleland CF, Roth J.** 1987. Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and Lemna gibba G3. *J. Biol. Chem.*, 262: 6238-6247.
- Collip JB.** 1923. Glucokinin. *A new hormone present in plant tissue. Preliminary paper. J. Biol. Chem.*, 56: 513-543,
- Crespo JL, Diaz-Troya S, Florencio FJ.** 2005. Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, 139: 1736-1749.
- Fingar DC, Blenis J.** 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*, 23: 3151-3171
- Franklin CI, Dixon RA.** 1994. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In Dixon R, Gonzales R (Eds.), *Plant Cell Culture – a practical approach*, 2nd ed., pp. 1-25. New York, USA: Oxford University Press Inc.
- García-Flores C, Aguilar R, Reyes de la Cruz H, Albores M, de Jiménez ES.** 2001. A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochem. J.*, 358: 95-100.
- Goodman DBP, Davies WL.** 1993. Insulin accelerates the

- postgerminative development of several fat-storing seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190: 440-446.
- Loyola Vargas VM, Vázquez-Flota F.** 2006. Plant Cell Culture Protocols. In Walker JM (ed.), *Methods in Molecular Biology*, 2nd ed., Vol. 318, pp. 51-58. Humana Press Inc. U.S.A.
- Manning BD, Cantley LC.** 2003. United at last: the tuberous sclerosis complex gene products connect the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway to mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Biochem. Soc. Trans.*, 31: 573-578.
- Mravec J, Kubes M, Bielach A, Gaykova V, Petrásek J, Skůpa P, Chand S, Benková E, Zázimalová E, Friml J.** 2008. Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development*, 135: 3345-3354.
- Matsuoka K, Demura T, Galis I, Horiguchi T, Sasaki M, Tashiro G, Fukuda H.** 2004. A comprehensive gene expression analysis toward the understanding of growth and differentiation of tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.*, 45: 1280-1289.
- Morgan DO.** 2007. *The cell cycle: principles and control*. New Science Press Ltd, Sinauer Associates, Inc., Publishers and Oxford University Press. U. K. 111-37.
- Nagata T, Hasezawa S, Inzé D.** 2004. When I encountered tobacco BY-2 cells!. Tobacco BY-2 cells. In Nagata T, Lörz H, Widholm JM (eds.), *Biotechnology in agriculture forestry*, Vol 53, pp. 1-5. Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag.
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S.** 1992. Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.*, 132: 1-30.
- Pearson RC, Dennis PB, Han NA, Williamson J-W, Kozma SC, Wettenhall EH, Thomas G.** 1995. The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *EMBO J.*, 14: 5279-5287.
- Sano T, Kuraya Y, Amino S, Nagata T.** 1999. Phosphate as a limiting factor for the cell division of tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.*, 40: 1-8.
- Saltiel AR, Kahn RC.** 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414: 799-805.
- Sánchez de Jiménez E, Beltrán-Peña E, Ortiz-López A.** 1999. Insulin stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiol. Plant*, 105: 148-154.
- Singh RJ.** 2002. *Plant cytogenetics*. CRC. Second edition. U. S. A. 463: 7-57, 277-326.
- STATISTICA ver. 8.0.** StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA.
- Turck F, Zilbermann F, Kozma SC, Thomas G, Nagy F.** 2004. Phytohormones participate in an S6 kinase Signal Transduction Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 134: 1527-1535.
- Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN.** 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. *J. Antibiot.*, 10: 721-6.
- Vlahos C.** 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.*, 269: 5241-5248.